

A XXI. század klinikai genetikai diagnosztikus és terápiás kihívásai, jelen lehetőségek

Dr. László Aranka, Dr. Karg Eszter, Dr. Túri Sándor
SZTE Gyermekgyógyászati Klinika, Kórbonctani Intézet, Szeged,
PTE Gyermekgyógyászati Klinika, Pécs

A *biotinidase defektus* jól kezelhető kórkép, európai és USA szűrőcentrumok programjában újszülöttkori szűréssel szerepel. MS/MS diagnosztika alkalmas a holocarboxylase syntethase hiány kimutatására.

Multiplex carboxylase hiány okaként az Apo enzimek hiányos aktivációja tehető felelőssé, a biotin felszabadulás hiányos, a proteinkötött biotinból való biocytin felszaporodás hiánya következtében vagy szerzett biotinhoány esetén fordul elő.

Klinikai tünetek: metabolikus acidosis, idegrendszeri tünetek, hypotonia, görcsök, pszichomotoros retardatio, bőrtünetek, alopecia, immundefektusok.

Manifesztáció, onset, csecsemő vagy kisgyermekkorban biotinidase hiány formájában.

Laboratóriumi diagnosis: laktát acidosis, hyperammoniaemia, plasma aminosav eltérések: hyperalaninaemia, csökkent carnitin, vizeletben és liquorban emelkedett laktát, 3-OH-izovaleriánsav, methyl-crotonyl-glycin, metylcitrát stb.

Enzymdefektusok: biotinidase, carboxylasok (fibroblastból és lymphocytákból).

PCC = pyruvát-CoA-carboxylase, 3-methyl-crotonyl-CoA carboxylase
PC = pyruvát-carboxylase, MMC = methyl-malonyl-CoA carboxylase

Heterogén csoportot képviselnek, mely a genetikai statustól függő. Bio-kémiai defektusként mitochondrialis energia anyagcsere defektusai is szerepelhetnek.

Th.: rendszeresen nem szükséges enyhe formánál. Döntő az alacsony proteintartalmú diéta, L-carnitin pótlás 150-200 mg/kg, L-glycine.

Humán 3-methyl crotonyl CoA carboxylase defektus

Öröklődés: a biotin rezisztens 3MCC hiány autosomalis recesszív.

A leucin katabolizmus zavar, a leggyakoribb organikus aciduria.

Újszülöttkori szűrés MS/MS.

Génstruktúra az MCCA és MCCB gének klónozása megtörtént, biotin tartalmú alpha- és a kisebb beta alegységek klónozása is, azaz a strukturális gén organizációjának tisztázása.

(Baumgartner és mtsai. 2001) J. Clin. Invest 107. 495-504

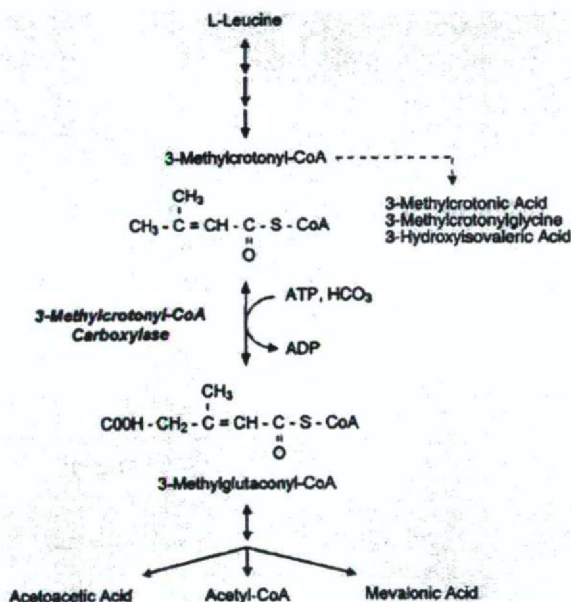
Az előbbi szerzők 14 MCC defektusos egyént vizsgáltak két alcsoportban, CG1 és 2, MCCB és MCCA mutációkat detektáltak. Az MCCA mutások közül 5 és az MCCB mutáns allélok közül 9 formát mutattak ki, missense mutációt eredményezve, az enzim funkcióvesztésével.

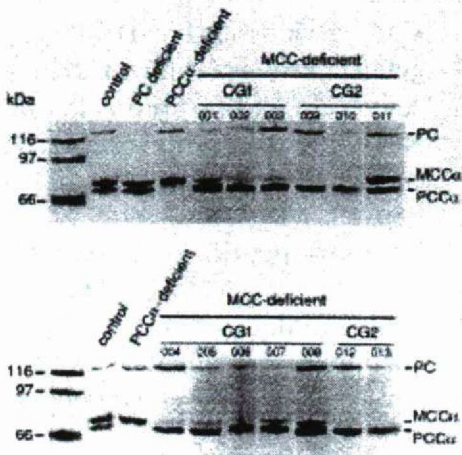
MS/MS újszülöttkori szűréssel váratlanul jelentős számú organikus aciduria fedhető fel, beleértve az MCC hiányt. (Levi HL 1998.)

Humán és egér MCCA és B lókuszokat klónozták.

Génlocus: MCCA 3q25-q27, MCCB 5q12 – q13.1

1. ábra
Az MCC által katalizált reakció és a leucin katabolizmus és metabolitjai





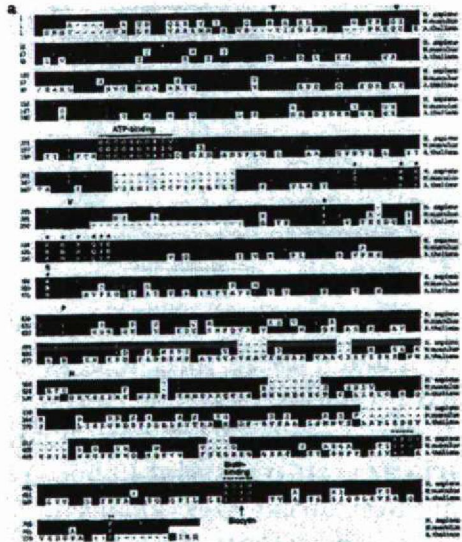
2. ábra

Fibroblastban az MCC-alpha alegység biotin tartalmának expressziója. Fibroblast kultúrából a mitochondriális dús frakciókban szeparálták a proteinek, SDS-PAGE gélen, valamint az MCC, PC és PCC biotin tartalmú alegységeit detektálták avidin alkalikus foszfatáz konjugátummal. A CG2 betegekben hiányoztak az MCC-alpha alegységek, míg a CG1 betegekben kimutathatók voltak

3. ábra

Humán MCC-alpha és MCC-beta szekvenciák megegyező részei *A. thaliana* egérrel (világos struktúrák). Az NH2 terminális potenciális hasító helyei vertikális nyílhegyekkel jelezve.

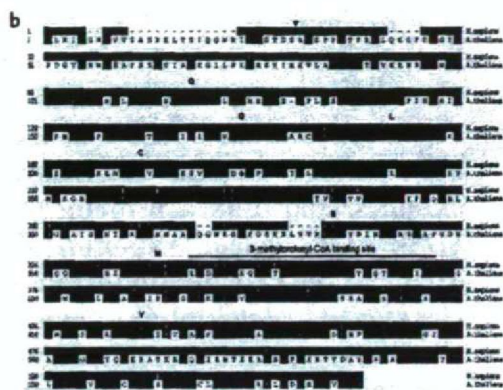
a., A humán, egér és *A. thaliana* MCC-alpha szekvenciája. Az N terminálisban jelezve az ATP-kötő



kazetta, és a carboxyterminális biotinkarboxyl carrier domainja. A nyíl jelzi a lysin residuumot, amely kovalensen kötődik a biotinhoz, biocytint képezve. A residuumokat csillagokkal jelölték, a biotin karboxylatios domainon belül a szerzők úgy gondolják, hogy ezen génrészlet játszik szerepet a katalízisben.

(Waldrop és mtsai. 1994)

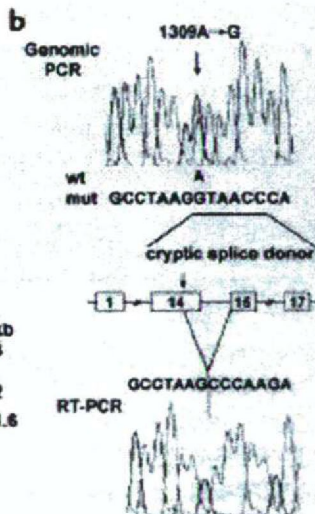
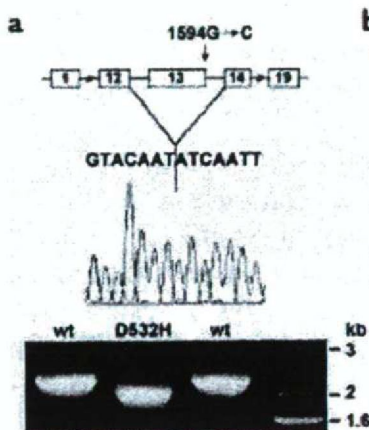
b., humán és *A. thaliana* MCC-beta szekvenciája látható. A putatív 3-methyl-crotonyl CoA kötő domaint felső vonallal jelezték.



MS/MS. A sávok az identifikált MCC-alpha és beta egységeket reprezentálják.

4. ábra

Coomassie-festett SDS-PAGE gélen biotintartalmú proteinek egér vese-extractumból kivonva Dynabets streptavidinnel. A gélből kivágva a proteineket tripszinnel emésztették, és triptikus peptidek használatával MALDI-TOF-fal elemezték és liquid chromatographiával ESI-



5. ábra.

a., Az MCCA és B missense mutációjának ábrázolása aMCCAD532H.

Az 1594.

kodonban guanin-cytozin csere történik a 13-as exonban az utolsó bázispáron, amely eredményezi a D502H missense mutációt.

b., MCCBI437V

mutáció az 1309 kodonban adenin és guanin csere történt a 14-es exonban, amely az izoleucin valinnal való pótlását eredményezte. A mutáció aktiválta a splice donort, az új kötődési hely miatt deletálódott a 14-es 64 utolsó bázispárja az érett transcriptumból. Az alsó panel mutatja az RTPCR produktum direkt szekvenálását. A compound heterozygota beteg nem termel kimutatható RNA-t.

1. táblázat. Az MCC A. mutáns allélokat tünteti fel. Láthatók az enyhe és súlyos klinikai phenotypusok, a betegek etnikai eredete, az allélváltozások a megadott exonokban, valamint a nukleotid cserék

MCCA mutant alleles

No.	Allele	Exon	Nucleotide change	Clinical phenotype ^A	Ethnic origin	Proband
1	R385S	11	1155A→C	Severe	German	011 ^B
2	Q421fs(+1)	11	1264insG	Mild	Swedish/Amer.	013 ^C , 010 ^B
3	A289V	8	866C→T	Mild	American	012 ^C
4	D532H	13	1594G→C ^D	Severe	Turkish	009 ^B
5	L437P	12	1310T→C	Severe	Argentine	014 ^B

^AMild: late onset, good recovery after acute attack, no or mild developmental delay; severe: onset in infancy, severe neurological involvement with severe developmental delay.

^BHomozygous. ^COnly one allele identified. ^DAlters splicing (Figure 5a).

2. táblázat. Az MCCB mutáns allélok az 1. tábl. sémája szerint

MCCB mutant alleles

No.	Allele	Exon	Nucleotide change	Clinical phenotype ^A	Ethnic origin	Proband
1	R155Q	5	464G→A	Mild	Vietnamese	006
2	P310R	10	929C→G	Mild	Vietnamese	006
3	S173fs(+1)	6	518insT	Mild	Swiss/Mennonite ^B	004 ^C , 015 ^D
4	I437V	14	1309A→G ^E	Mild	Dutch	003 ^C
5	R193C	6	577C→T	Mild	Dutch	005
6	Ins5ac-1G→A		Ins5ac-1G→A	Mild	Dutch	005
7	S173L	6	518C→T	Severe	Turkish	001 ^D
8	E99Q	4	295G→C	Severe/mild	Turkish/Amish	002 ^D , 016 ^D
9	V339M	11	1015G→A	Severe	Turkish	007 ^C , 008 ^C

^AMild: late onset, good recovery after acute attack, no or mild developmental delay; severe: onset in infancy, severe neurological involvement with severe developmental delay. ^BDetected by newborn screening. ^COnly one allele identified. ^DHomozygous. ^EActivates cryptic splice donor (Figure 5b).

Előadásunkban egy (P.R.) négy hónapos korban bágyadság, aluszékonyság, táplálási nehézség miatt felvételre került gyermek esetét szeretnénk ismertetni, akinél néhány hetes progresszió után gépi lélegeztetést kellett kezdeni. Közben a betegség aetiológiája miatt igen kiterjedt (serum, liquor, vizelet vizsgálatok, aminosav analysis, Mass tandem spectrometria, izombiopsia, képalkotó eljárások – UH, rtg, CT, MR) vizsgálatokat végeztünk, amelyek végül igazolták veleszületett, ritka anyagcsere-betegségét: 3-methyl-crotonyl-glycinuriáját. A diétával, biotin pótlással

lással, tüneti kezeléssel, és természetesen a nővérek és a szülő gondos ápolásával 23 hónapon keresztül, lélegeztetve ápoltuk klinikán Intenzív Osztályán. Bemutatását ritka, de részletes kivizsgálással igazolható anyagcsere-betegsége, valamint néhány, ápolásával kapcsolatban felmerülő etikai kérdés (tartós gépi lélegeztetés) miatt tartottuk érdemesnek bemutatni.

3-methyl-crotonyl glycinuria, mint a leggyakoribb organikus aciduria (3 MCG nőtestvérekben)

Családi anamnesis: Az anya egyik bátyja PKU-s, korán diagnosztizált, diétáztatott, kitűnő mentális statusú.

S.E. (1985.04.15.)

Perinatalis adatok: Az anya első zavartalan terhességéből született 3100 g-mal. Motoros és mentális fejlődése 3,5 éves koráig szabályos volt.

Anamnesis, klinikum: Kisded korában gyakran elesett, egyensúlyzavar, ataxia, torti collis jelentett problémát.

Az EEG normális elektromos aktivitást mutatott.

A **koponya CT** enyhe pathológiai leletként enyhén kiszélesedett 4. kamrát igazolt (1989-ben). **Neurológiai status:** törzsataxia és rotatórikus nystagmus fejlődött ki, beszéde skandálóvá vált.

A megismételt **CT később cerebelláris atrophíát igazolt.**

Myelographia negatív volt, **liquorlelete** normális, eltekintve az enyhén fokozott IgG-től (8,53 mg/nap) beleértve az intrathekális IgG szintézist.

Az **EMG** enyhe deceleratiót bizonyított a peroneuson.

Laboratóriumi leletei közül az enyhe pyruvát-emelkedés említendő.

Mentális fejlődése még intakt volt. 4 éves korától görcsök jelentkeztek, az arc hirtelen kipirult, furcsa nyelőmozgásokat végzett, kézrángások kíséretében.

EEG-n bo. temporalis spike focust mutattak ki.

A vizelet aminosavakra, organikus savakra, glucosaminoglucanokra = GAG negatív volt. Éhezés ill. proteindús diéta, valamint zsírok acidosis nem provokáltak.

1990. februárjában a jobb fülére megsüketült, míg bal oldalon enyhébb volt a nagyothallás. Járási zavara gyorsan súlyosbodott, ataxia és generalizált hypotonia. 1991-re kétoldali teljes sükettség alakult ki. A **megismételt CT** extrém fokú tágult cerebelláris liquorutakat és kisagysorvadást mutatott. A lumbálpunctiós liquorlelet nem volt pathológiásnak minősíthető, bár **intrathekális IgG szintézis és oligoklonális gammopathia** igazolódott.

1991. júniusában az *ideg és izombiopsiás lelet* normális volt.

Th.: Egyedi vagy kombinált antiepileptikus kezeléssel nem lehetett görcsmentes állapotba hozni. Emiatt gyakran szorult kórházi kezelésre. A progresszív tünetek mögött neurometabóliás kórképet sokáig nem lehetett bizonyítani, lipoic acid és L-carnitin pótlásban részesült, feltételezett mitochondrialis vagy egyéb nem bizonyított enzimdefektus gyanújával.

10 éves korában veszítette el járóképességét.

S.A. (1988.03.11.)

Perinat. amnesise: negatív.

2001. nyarán hosszan tartó hurutos megbetegedés után derült ki enyhe hallásvesztése, MR-rel nem találtak pathológiás kórfolyamatot. Bár a cerebellum a szokottnál kisebb méretű volt.

A BERA vizsg. nem jelzett retrocochlearis laesiot.

2002. januárjában a BERA már mko. retrocochlearis pályakárosodást mutatott.

2002. februárjában a liquorban intrathekális IgG szintézis igazolódott. A neurológiai kivizsgálás nem tisztázta a pathológiás leépülés jeleit, kivéve a bilaterális szenzorineurális hypakusist.

Az EEG vizsg. szabályos alpha típust mutatott pathológiás jelek nélkül. A fiatal hölgybeteg aktív sportoló. Megkísérelte hallókészülék használatát, amely rontott a statusán javítás helyett.

A múlt századot joggal nevezték a genetika századának, befejeződött a Humán Genom Program, igazolták a különböző, főként enzymopathiás monogénis kórformák chromosomal locusait, a specifikus enzymdiagnosztikus és molekuláris genetikai diagnosztikus módszereket.

Kifejlesztett *diagnosztikus módszerek*: kvantitatív aminosav analýzes analysis.

MS/MS mass tandem spectrometria: (35 kórkép diagnosisa) a rövid-, közép- és hosszúláncú zsírsavak beta-oxidációs defectusok metabolitjainak acylcarnitin formái, aminoaciduriák, organikus aciduriák metabolit kimutatása.

Saját esetek

Jávorfaszörp-betegség (MSUD), az elágazó láncú aminosavak (leucin, isoleucin, valin) lebontási zavara, ketosav-dehydrogenase defektus miatt; 3 eset.

Fumáraciduria: spasztikus paresis képében megnyilvánuló motoros és mentális leépülés; 1 eset.

Középláncú acyl-CoA-dehydrogenase defektus=MCAD (C8-C10 acilkarnitinek felszaporodása, MS/MS mass tandem analysissal bizonyítható); 3 eset.

Rövid-, közép- és hosszúláncú zsírsavak quantitativ analysise (MS/MS) mitokondriális betaoxidációs zavar következményeként;

VLCFA = igen hosszúláncú zsírsavak defektusai:

- *Zellweger-syndroma* = oculocerebro-renal syndroma,
Öröklődés: *autosomalis recesszív*
- *Adrenoleukodystrophia*,
Öröklődés: X-hez kötött recesszív
- *Chondrodysplasia punctata* multiplex subluxatiokkal, többszörös orthoped műtéttel, (Prof. Dr. Mészáros T.) 8 hónapos román csecsemő betegünk.

Galactosaemia

Chromosomalis génlokuszok:

<i>Galactose-1-foszfát-uridyl transferase (G1PUT)</i>	<i>9p13</i>
<i>Galactokinase (GK)</i>	<i>17q21-22</i>
<i>Galactose-4-epimerase</i>	<i>1p36-35</i>

A galactosaemia öröklésmenete *autosomalis recesszív*, génlokusza 9p13. Gyakorisága az európai populációban 1:40000 újszülött (*Schweitzer-Krantz 2000.*), a kínai populációban viszont 1:400000 újszülött (*Cheung, Tang és mtsai 1999.*).

Hazánkban 1975 és 1997 között az SZTE ÁOK Gyermekgyógyászati Klinika Anyagcsere Laboratóriuma a G-1-PUT deficiencia frekvenciáját Kelet-Magyarország vonatkozásában 1:53487-nek találta. (*Havass, Sallay személyes közlés.*)

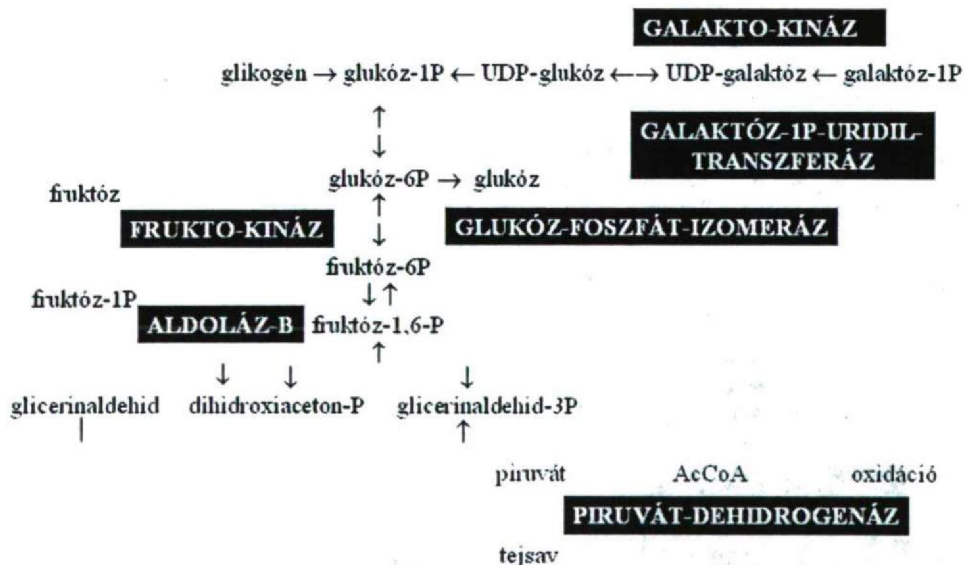
A Budapesti Szűrőcentrum adatai szerint G1PUT defektus gyakorisága 1:55000, galactokinase 1:150000 (1996).

A galactosaemia molekuláris genetikai aspektusai

1. A *G-1-PUT* gént a 9p23 régióra lokalizálták, és a gén számos mutációját azonosították, pl.: Q 188R, K285N, S135L és N314D. A betegek zöme kevert (compound) heterozygota, megjelenésüket nemcsak az allél összetétel, hanem az allél kombináció is meghatározhatja. A galactosaemia fő mutációjában (Q188R) az arginint glutamin helyettesíti a 6-os exon 188-as kodonjában, a kaukázusi galactosaemiás populáció közel 70 %-ában (Lesli és mtsai 1992, Elsas és mtsai 1993, 1994, Podskarbi és mtsai 1994). K285N mutáció esetén a 9-es exonban az asparagin helyén lysin áll (Reichardt és mtsai 1992).

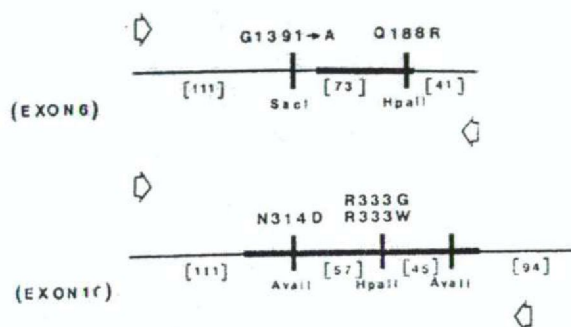
A magyar roma betegek genotípusát L. Kalaydjieva és László A. vizsgálta (2002), és ugyanazt az alapító "founder" mutációt (P28T) találta a GK 1 génben, mint Bulgáriában, Spanyolországban, Belgiumban és Svájcban élő roma betegek esetén. A galaktokináz defektusos homozygota gyermekek valamennyien P28T/P28T homozygota genotípusúnak bizonyultak, míg az obligatorikus génhordozó szülők a P28T mutatoria heterozygoták voltak, azaz a szüleiktől 1 kóros mutánst és 1 ép allélt örököltek.

galaktóz

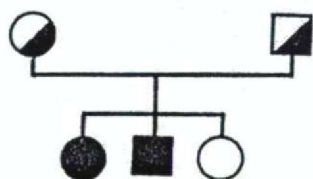




N314 D

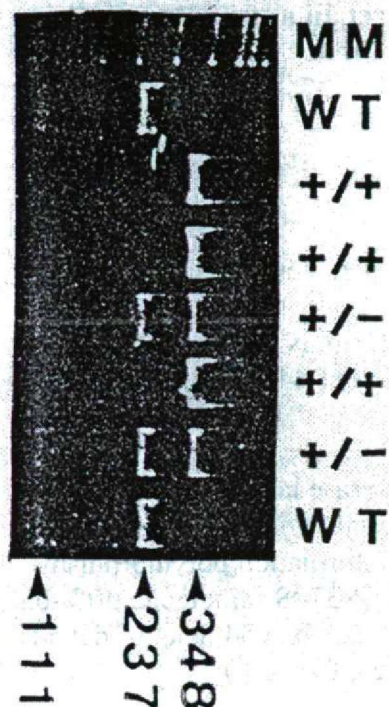


Q188R MUTATION

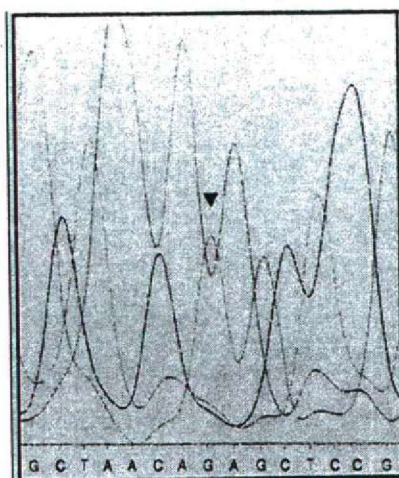


Restriksiós enzymanalysis

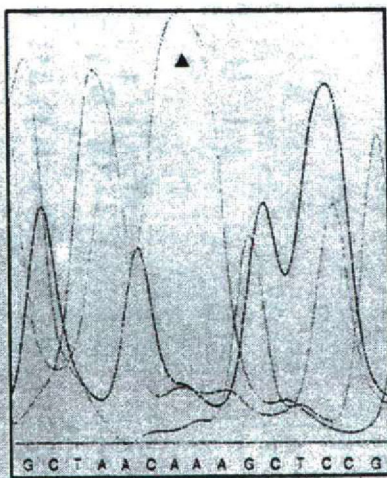
G1391A in D2



G1PUT defektusos galactosaemia
főmutációja:
a 188-as kodomban a glutamint
arginin váltja fel.



WT = vad, normál típus
(+/+)



Duarte 2 mutáció G 1391 A

Duarte2 variáns, Duarte2/normál heterozygota

A G1PUT gén 6 exonjának polymeráz láncreakcióval (PCR) felszaporított DNS mintázatának direkt szekvenált autoradiogramja.

A = adenin C = cytozin G = guanin T = timin

Lipidosisok

Gaucher-kór: enzimdefektus glucocerebrosid beta-glucosidase,
Génlocus chrom. 1q21.

Öröklődés: autosomalis recesszív.

Klinikai tünetek: hepatosplenomegália, hypersplenismus: anaemia,
thrombocytopenia, leukopenia.

Molekuláris genetikai diagnosztika: főmutáció: N370S,

Neurológiai Gaucher-kórra jellemző mutáció: L444P,

84-es kodon guanin mutációja: 84GG,

Intronális mutáció: IVS2+1

Molekuláris genetikai diagnosztika: polymerase láncreakció = PCR

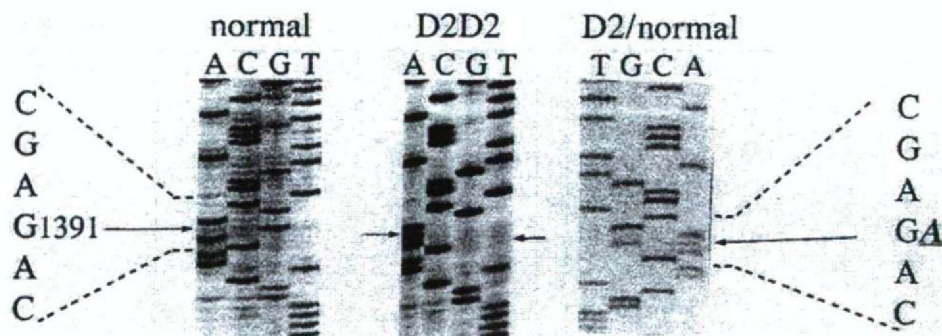
(polymerase chain reaction) és magányos szálú konformációs

polymorphismus = SSCP (single strand conformation polymorphism)

PCR/SSCP analysis eredmények: 74%-ban N370S főmutáció, 20%-ban

B370S/L444P kettős heterozygota mutatio, 6%-ban 54 deletio (del.54)

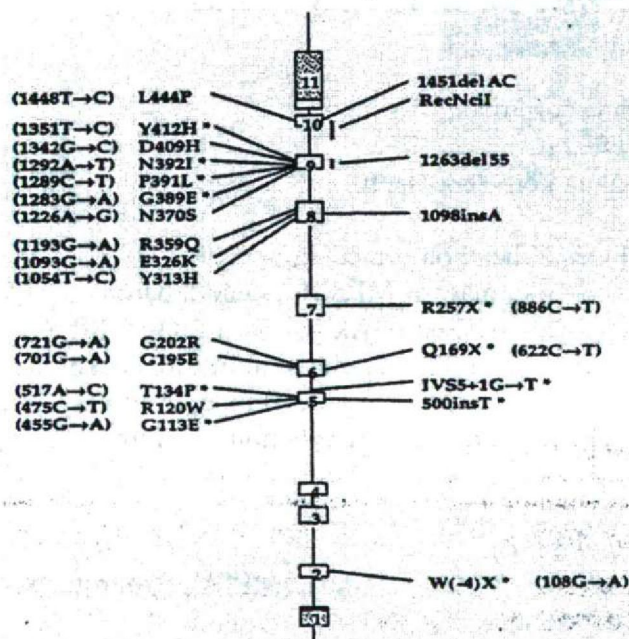
(László A., A. Chabas, Endreffy E., Sally É., Raskó I.)



Molekuláris genetikai mutációs analysis

Pozíció hely	Bázispótlás Típus	Aminosav-csere	Restrikciós
476	G-A	Arg-Glycin	Bst NI, EcoRII
I.			
226	A-G	Aspar-Serin	Bst NI, EcoRII
I.			
1361	C-G	Prolin-Arg.	HhaI
1448	T-C	Leucin-Prolin	Ncl
N370S		Aspar-Serin	II.
L444P		Leucin-Prolin	I-II-III.
D409H			I.
1263-del 55			

Gaucher pontmutációk vázlatos ábrázolása



Homocystinuria

Homocystinuria
(aminoaciduria)

Klinikai tünetek:
marfanoid phenotypus
(gigant termet), szem-
lencse-subluxatio,
mentális retardáció

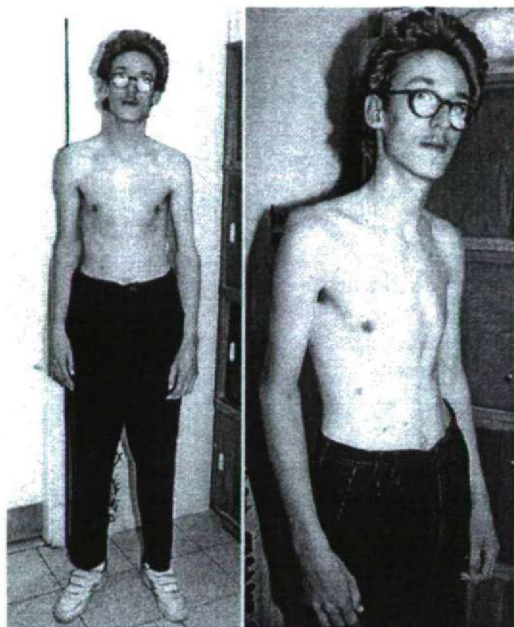
Öröklődés:
autoszomális recesszív

Enzymdefektus:
cystation-beta
synthase (CBS)

Mutációs analysis
(PCR/RFLP) : PI45L:-
/-, R125Q:-/-,
1278T:+/-, G307S:-/-

Pheno-genotypus össz-

szehasonlító analysis: a 125 kodonban létrejövő arginin glutamincsere kivételével a többi enyhe forma, jó prognózisú.



Homocystinuriás beteg

Fabry-kór = Angiokeratoma corporis diffusum

Ok: alpha-galactosidase defectus.

Öröklődés: X chromosomához kötött recesszív.

Mutatis analysis:

MPS II. Hunter-kór, öröklődés X-hez kötött recesszív (XLR)

Molekuláris genetikai diagnosztika magyar MPS II. családokban:

4 családban történt mutációs analysis, az egyikben 16, a másik MPS II. családban a hemizygota fiúbetegben 22 irregularis aminosav beékelődése (=insertio) igazolódott Aranka László, Susanne Bunge, Andreas Gal, (SZTE Gyermekgyógyászati Klinika, Szeged, Hamburg, Hum. Genet. Inst.).

Enziminfusios therápiás lehetőségek

Lysosomalis enzymopathiakban: MPSI (Hurler), MPSVI (Maroteaux-Lamy),

Glycogenosis II. típus = Pompe kór = Alpha-1-4- glucosidase defectus,

Lipidosisek : Gaucher-kór és Fabry-kór (XLR)

Csontvelő transplantatio (T-sejt mentesített vagy összejt-átültetés, elterjedtebb módszer lipidosisekban: MPS, Mucopolipidosis, Heredodegeneratív idegrendszeri kórképekben

Praenatalis enzim és mol.genet. dg.

Preventív jelleggel az adott családokban, chorionboholy biopsiából, direkt homogenizálással, tenyésztés nélkül, specifikus enzim módszerrel vagy a szükséges molekuláris genetikai analysisssel.

Gén terapia elve

Vektorok kérdése, DNS szakaszok, Knock-out (génkiütött) állatmodellekben MPS, ML, lipidosisokban és leukodystrophiákban.

Humán gén terapiás kísérletek cystás fibrosisban nasalis nyálkahártyába történő gén particulum átvitel

Dystrophia musculorum progressivában (DMP) (X-hez kötött recesszív öröklődésű Duchenne és Becker típusban) közölt ébrényi myoblast kultúra átültetés állatkísérletben került közlésre.

Microarray diagnosztikus chip alkalmazásával rutinterápiára elérhetetlen, cystás fibrózisban, lipidózisokban, myopathiákban, Dupuytrenn kontraktúrában ismert.